

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Patentschrift
10 DE 43 06 832 C 1

51 Int. Cl. 5:
C 12 N 15/82
A 01 H 1/00

21 Aktenzeichen: P 43 06 832.4-41
22 Anmeldetag: 4. 3. 93
43 Offenlegungstag: —
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 24. 2. 94

DE 43 06 832 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 37073 Göttingen, DE

74 Vertreter:

Frhr. von Pechmann, E., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.;
Behrens, D., Dr.-Ing.; Brandes, J., Dipl.-Chem.
Dr.rer.nat.; Goetz, R., Dipl.-Ing. Dipl.-Wirtsch.-Ing.;
von Hellfeld, A., Dipl.-Phys. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte;
Würtenberger, G., Rechtsanwalt, 81541 München

72 Erfinder:

Becker, Dieter, 5020 Frechen, DE; Rohde, Wolfgang,
Prof. Dr., 6305 Buseck, DE; Randles, John W., Prof.
Dr., St. Julians, South Australia, AU; Salamini,
Francesco, Prof. Dr., 5000 Köln, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

Virology 176, 1990, S. 648-651;

54 Verwendung einer Virus-DNA als Promotor zur gewebespezifischen Expression von Genen in transgenen
Pflanzen

57 Beschrieben wird die Charakterisierung und Verwendung
eines starken viralen Promotors zur gewebespezifischen
Expression von Genen in transgenen Pflanzen. Die Erfindung
beruht auf der Erkenntnis, daß eine CFDV DNA (coconut
foliar decay virus DNA) eine als Promotor aktive Region
enthält und dieser Promotor, obwohl er aus einem monoko-
tylen Pflanzen infizierenden Virus stammt, immerhin 30-50%
der Aktivität des starken CaMV35S-Promotors in Protoplas-
ten der dikotylen Pflanzen Tabak und Kartoffel aufweist und
diese Aktivität selektiv auf das Phloem beschränkt ist.

DE 43 06 832 C 1

Beschreibung

Es ist allgemein bekannt, daß sich mittels gentechnologischer Arbeitstechniken gezielt einzelne Gene in das pflanzliche Genom übertragen lassen. Diese als Transformation bekannte Technik wird routinemäßig auf verschiedenen Wegen durchgeführt, z. B. durch "particle gun bombardment" (vgl. M. E. From, F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas und T. M. Klein: "Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants", *Bio/Technology* 8: 833—839, 1990), "nackten DNA-Transfer" (vgl. P. Meyer, I. Heidmann, G. Forkmann und H. Saedler: "A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene", *Nature* 330: 677—678, 1987) oder durch Agrobacterium-vermittelte stabile Integration von Genen oder Genabschnitten in das Genom der Empfängerpflanze. Als Alternative zur chromosomalen Integration von Fremdgenen können z. B. extrachromosomal replizierende Vektoren, die aus Pflanzenviren entwickelt wurden (vgl. J. W. Davies und J. Stanley: "Geminivirus genes and vectors", *Trends Genet.* 5: 77—81, 1989), benutzt werden, um Fremdgene ohne Integration in Pflanzen zu exprimieren. Die in Pflanzen zu exprimierenden Fremdgene müssen zu diesem Zweck unter die Kontrolle von Regulationssignalen (Promotor, Terminator) gebracht werden, die entweder für eine konstruktive, gewebe- und/oder entwicklungsspezifische Transkription sorgen. Außerdem ist es wünschenswert, durch Verwendung eines starken Promotors eine erhöhte mRNA-Synthese des Fremdgens zu bewirken.

Ein bekannter Promotor, der die Anforderungen an einen starken, konstitutiven Promotor erfüllt und daher vorwiegend für die Pflanzentransformation eingesetzt wird (vgl. R. Walden: "Genetic Transformation in Plants", Open University Press, Milton Keynes, 1988) ist der 35S-RNA-Promotor des cauliflower mosaic virus (CaMV). Nachteilig an dem bekannten CaMV 35S-Promotor ist seine geringe Aktivität in Monokotyledonen und im Phloemgewebe.

Aufgabe der Erfindung ist es, einen starken Promotor bereitzustellen, der sich zur gewebespezifischen Expression von Genen in transgenen Pflanzen eignet und der in Monokotyledonen als auch in Dikotyledonen aktiv ist.

Es wurde gefunden, daß die gestellte Aufgabe durch die Gegenstände der Ansprüche 1 und 2 gelöst werden. Gegenstand der Erfindung ist demzufolge die in den Ansprüchen gekennzeichnete Verwendung.

Der Erfindung liegt die Beobachtung zugrunde, daß ein Monokotyledonen infizierendes Virus im vaskulären System der Pflanze lokalisiert sein kann. So hat sich z. B. gezeigt, daß das die Kokosnußpalme *Cocos nucifera* befallende Virus CFDV (coconut foliar decay virus) im vaskulären System der Pflanze lokalisiert ist (vgl. J. W. Randles u. a.: "Localization of coconut foliar decay virus in coconut palm", *Ann. Appl. Biology* 1992, im Druck).

Eine mit den Krankheitssymptomen und dem Auftreten von Viruspartikeln assoziierte DNA wurde bereits kloniert, sequenziert und ihre Struktur bestimmt (vgl. W. Rohde u. a.: "Nucleotide sequence of a circular single-stranded DNA associated with coconut foliar decay virus", *Virology* 176: 648—651, 1990). CFDV ist ein neuartiges virales Phytopathogen mit einem Genom aus einzelsträngiger, zirkulärer, kovalent geschlossener DNA. Bisher ist nur ein einziges DNA-Molekül des CFDV mit einer Größe von 1291 Nukleotiden sowie Deletionsmutanten davon beschrieben worden (vgl. Rohde u. a., *Virology* 176: 648—651, 1990). Damit ist CFDV kein Vertreter der Geminivirus-Gruppe, sondern bildet vermutlich den Prototyp der neuen DNA-Virusgruppe der "Circoviren".

Für die Phloemspezifität dieses Virus könnten verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Für PLRV z. B., einen Vertreter der Luteovirusgruppe, konnte gezeigt werden, daß eine Suppressor-tRNA, auf die das Virus für seine Genexpression angewiesen ist, nur im Phloem vorhanden ist und dadurch die Virusausbreitung über dieses Gewebe hinaus verhindert (Rohde u. a., unveröffentlichte Daten).

Regulatorische Sequenzen für die Transkription von CFDV-Genen sind bisher nicht beschrieben worden.

Überraschenderweise konnte auf dem CFDV-Genom ein starker Promotor für die Transkription, der auch in Dikotyledonen (z. B. Tabak, Kartoffel) aktiv ist (in transienter Expression ca. 30—50% der CaMV 35S-Promotor-Aktivität) und in transgenen Tabak-Pflanzen eine selektive Gewebespezifität (Aktivität im primären und sekundären Phloem) aufweist, identifiziert werden.

Durch die Erfindung wird erreicht, daß in transgene Pflanzen eingebrachte Gene stark und spezifisch im Phloem exprimiert werden. Ein wichtiger Anwendungsbereich ist z. B. die phloemspezifische Expression von luteoviralen Genen mit dem Ziel, virusresistente Pflanzen zu schaffen. Luteoviren wie z. B. PLRV (potato leafroll virus) sind phloemspezifisch replizierende Viren, und der bislang verwendete CaMV 35S-Promotor zeigt nur schwache Aktivität im Phloemgewebe.

Untersuchungen zur Promotorregion und -stärke

Für Untersuchungen zur Promotorregion und -stärke durch transiente Expression in Protoplasten (Tabak, Kartoffel) wurde die 1291 Nukleotide große CFDV cDNA (vgl. Rohde u. a., *Virology* 176: 648—651, 1990) aus einem Plasmid mit dem Restriktionsenzym XhoI herausgeschnitten und als Gesamtsequenz sowie — nach Verdau mit weiteren, geeigneten Restriktionsenzymen (Fig. 3A, 3B) — als subgenomische Fragmente im Plasmidvektor pUC19GUS in transkriptionelle Fusion zum Gen der β -Glukoronidase (GUS) gebracht. Die erhaltenen Plasmide wurden in Experimenten zur transienten Expression mit einem entsprechenden CaMV 35S-Konstrukt verglichen.

Untersuchungen zur Gewebespezifität

Für Untersuchungen zur Gewebespezifität wurden geeignete CFDV-Fragmente XhoI, StyI, NarI und AflIII in den binären Agrobacterium tumefaciens-Vektor pBIN101.1 (R. A. Jefferson u. a.: "GUS fusions: β -glucuronidase

as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants", EMBO J. 6: 3901—3907, 1987) vor das GUS-Reportergen kloniert, in Agrobakterienzellen eingebracht und mit Hilfe der als Transformation bezeichneten Arbeitstechnik stabil in das Genom des Tabaks (*Nicotiana tabacum* var. SR1) übertragen. Die nach Selektion mit dem Antibiotikum Kanamycin erhaltenen Kalli wurden in Gewebekultur zu Pflanzen regeneriert und mit Ausnahme des XhoI-Konstrukts im Gewächshaus herangezogen. Die Expression des GUS-Gens in den transgenen Pflanzen wurde durch Gewebeinfiltration mit einer Lösung des chromogenen Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glukuronid (Xgluc) nachgewiesen.

In den Figuren sind dargestellt:

Fig. 1 die schematische Struktur der CFDV DNA mit 6 möglichen offenen Leserastern. Der Pfeil weist auf die XhoI-Schnittstelle hin.

Fig. 2 die sogenannte "stem/loop"-Struktur; sie zeigt Homologie zu einer ähnlichen Struktur im Genom von Geminiviren und ist vermutlich für die Replikation des Virus verantwortlich.

Fig. 3A, 3B CFDV-Fragmente für die Herstellung chimärer Konstrukte zur transienten und stabilen Expression. Die verwendeten Restriktionsenzyme zur Herstellung einzelner, subgenomischer Fragmente und deren relative Lage in bezug auf das gesamte Genom sind dargestellt. Der schwarze Kasten entspricht der Lage der "stem/loop"-Region auf der mit XhoI geschnittenen CFDV cDNA.

A. subgenomische Fragmente mit Deletionen am 3'-Ende der CFDV DNA;

B. subgenomische Fragmente mit Deletionen am 5'-Ende der CFDV DNA.

Anwendungsbeispiel

I. Transiente Expression des StyI/GUS-Konstrukts in Tabak-Protoplasten

I.1. Protoplastenmedien

K3:

Makroelemente:

Mikroelemente:

25 mM KNO_3
 1 mM NaH_2PO_4
 6 mM CaCl_2
 3 mM NH_4NO_3
 1 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 1 mM MgSO_4

100 μM H_3BO_4
 130 μM MnSO_4
 40 μM ZnSO_4
 5 μM KCl
 1 μM CuSO_4
 1 μM CoCl_2

Eisen in EDTA:

Vitaminlösung

1 μM FeSO_4
 1 μM Na_2EDTA

270 μM Glycin
 160 μM Nicotinsäure
 100 μM Pyridoxin
 3 μM Thiamin

Kohlenhydrate:

Hormone:

400 mM Saccharose
 1,7 mM Xylose
 0,5 mM Inosit

5,5 μM NAA
 1,0' μM Kinetin

pH 5,6 osmotischer Wert: 600 mOs

W5:

150 mM NaCl
 125 mM CaCl_2
 5 mM KCl
 5 mM Glucose
 pH 5,6 - 6,0

MaMg:

450 mM Mannitol
 15 mM MgCl_2
 0,1 % MES
 pH 5,6

I.2. Herstellung des StyI/GUS-Konstrukts für die transiente Expression

Als Ausgangsmaterial diente ein CFDV cDNA-Klon voller Länge. Dieser wurde erhalten durch XhoI-Verdau einer in vitro hergestellten doppelsträngigen, zirkulären Kopie der CFDV DNA (Fig. 1) und Klonierung in die XhoI-Schnittstelle des Plasmidvektors Bluescript II KS+. Die 1291 Nukleotide große CFDV DNA wurde mit XhoI aus diesem Ausgangsplasmid herausgeschnitten, mit dem Restriktionsenzym StyI nachgeschnitten und das entstandene subgenomische XhoI/StyI-Fragment (Fig. 3A; zum einfacheren Verständnis als StyI-Fragment bezeichnet) durch Elektrophorese im Agarosegel von den übrigen DNA-Fragmenten abgetrennt und durch Elektroelution isoliert. Zur Subklonierung wurden die überstehenden Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase-Reaktion in "flush"-Enden überführt.

Das StyI/GUS-Konstrukt wurde hergestellt aus dem Vektor pUC103GUS, aus dem durch Verdau mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI der CaMV35S-Promotor entfernt worden war und dessen Enden in "flush"-Enden überführt wurden, und dem oben erhaltenen StyI-Fragment durch kovalentes Verknüpfen mit Th-induzierter DNA-Ligase. Nach Transformation kompetenter E. coli-Bakterien wurden einzelne Kolonien auf die Anwesenheit von Plasmiden mit dem in der gewünschten Orientierung mit dem GUS-Gen verknüpften StyI-Fragment überprüft.

I.3. Herstellen von Tabakprotoplasten

(vgl. I. Negrutiu u. a.: "Fusion of plant protoplasts: a study using auxotrophic mutants of *Nicotiana plumbaginifolia*, *viviana*", Theor. Appl. Genet. 72: 279—286, 1987)

Blätter (10 g) von in Gewebekultur herangezogenen *Nicotiana tabacum*-Pflanzen (var. SR1) wurden in 100 ml Enzymlösung für 16 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert und die erhaltenen Protoplasten durch Siebe (Maschenweite 100 µm) von groben Geweberesten abgetrennt. Die weitere Aufreinigung der Protoplasten erfolgte durch wiederholte Zentrifugation und Waschen mit K3-Medium, wobei sich die vitalen Protoplasten jeweils an der Oberfläche konzentrierten, sowie schließlich durch Resuspension in W5-Medium und Sedimentation durch Zentrifugation. Das Protoplasten-Sediment wurde in MaMg-Puffer aufgenommen und auf eine Konzentration von 10⁶ pro ml eingestellt.

I.4. Transformation von Protoplasten

(vgl. C. Maas und W. Werr: "Mechanism and optimized conditions for PEG mediated DNA transfection into plant protoplasts", Plant Cell Rep. 8: 148—151, 1989)

Zu jeweils 500 µl Protoplasten wurden 15 µl Plasmid/carrier DNA (entsprechend 10 µg StyI/GUS- bzw. CaMV35S/GUS-Plasmid DNA und 50 µg Kalbsthymus DNA) gegeben, die Suspension für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach vorsichtig mit PEG-Lösung (40% PEG4000, 0,1 M Ca(NO₃)₂, 0,4 M Mannitol) unterschichtet und sofort geschwenkt, bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach weiterer 30minütiger Inkubation erfolgte die Zugabe von 4 ml K3-Medium (mit Antibiotikum und Kinetinen) und die einzelnen Transformationsansätze wurden für 20 Stunden bei 25°C im Dunkeln gehalten.

I.5. Analyse der Protoplasten-Transformationen

Die Protoplasten-Ansätze wurden nach 20 Stunden mit W5-Medium auf 10 ml aufgefüllt, zentrifugiert, die sedimentierten Protoplasten nach Resuspension in 1 ml W5-Medium erneut abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Bestimmung von Proteinmenge und GUS-Enzymaktivität mörserte man die Protoplasten in 50 µl GUS/Extraktionspuffer und bestimmte die GUS-Aktivität mit 4-Methyl-umbelliferyl-β-D-glucuronid (4-MUG; vgl. R. A. Jefferson: "Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system.", Plant Mol. Biol. Rep. 5: 387—405, 1987) und die Proteinmenge nach Bradford (vgl. M. Bradford: "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramme quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding", Anal. Biochem. 72: 248—254, 1976).

II. Stabile Expression des StyI/GUS-Konstrukts in transgenen Tabakpflanzen

II.1. Transformationsmedien

MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962)

Murashige-Skoog-Pulver	4,5 g/l
Inosit	100 mg/l
Glucose	30 g/l
Agar	8 g/l

Der pH-Wert wurde auf 5,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde die Vitaminstocklösung ab einer Temperatur von 48°C zugefügt.

Vitaminstocklösung 1 ml/l

Glycin	20 mg/ml
Nicotinsäure	5 mg/ml
Pyridoxinhydrochlorid	5 mg/ml
Thiaminhydrochlorid	1 mg/ml

MS-Medium zur Induktion des Sproß- und Wurzelwachstums

Zur Induktion des Sproß- und Wurzelwachstums aus undifferenziertem Kallusgewebe wurden auf 1 l MS-Medium die unten aufgeführten Hormone gegeben. Das Antibiotikum Claforan diente zur Abtötung der Agrobakterien, während mit Kanamycin auf transformierte Pflanzen selektioniert wurde.

Hormone

Zeatin	2 mg/l
Naphtoleessigsäure	20 µg/l
Gibberellin A ₃	20 µg/l

Antibiotika

Claforan	500 mg/l
Kanamycin	100 mg/l

Später, nachdem die Wurzelbildung eingesetzt hatte, wurden die Pflanzen auf hormonfreiem Medium weiterhin in Gegenwart der Antibiotika kultiviert.

II.2. Herstellen des StyI/GUS-Konstrukts für die stabile Transformation

Das wie oben erwähnt (I.2) erhaltene StyI-Fragment wurde in die SmaI-Schnittstelle des binären Agrobacterium-Vektors pBIN101.1 (vgl. R. A. Jefferson u. a., EMBO J. 6: 3901 — 3907, 1987) in Sinnrichtung vor das GUS-Gen kloniert, das erhaltene Konstrukt durch direkte Transformation in kompetente *A. tumefaciens*-Zellen (Stamm LBA4404) eingebracht und mit einer der erhaltenen Agrobacterium-Kolonien *N. tabacum* (var. SR1)-Pflanzen in an sich bekannter Weise (vgl. W. Rohde, D. Becker, B. Kull und F. Salamini: "Structural and functional analysis of two waxy gene promoters from potato", J. Genet. & Breed. 44: 311 — 315, 1990) nach der "leaf disc"-Methode transformiert. Die nach Antibiotika-Selektion (Kanamycin) erhaltenen Kalli wurden in Sterilkultur zu Pflanzen regeneriert und anschließend im Gewächshaus in Erde überführt und herangezogen.

II.3. In situ-Lokalisierung der GUS-Enzymaktivität in transgenen Tabakpflanzen

Der histochemische Nachweis der β -Glukuronidase (GUS) in Organen und Geweben erfolgte durch Infiltration von Teilen der erhaltenen transgenen Tabakpflanzen mit dem chromogenen Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glukuronid (Xgluc; vgl. R. A. Jefferson u. a., EMBO J. 6: 3901 — 3907, 1987). Dazu wurden die einzelnen Pflanzenteile über Nacht bei 37°C mit einer Lösung von 500 µg/ml Xgluc in GUS-Extraktionspuffer infiltriert. Zur Dokumentation wurden Stamm- und Blattsschnitte mit einer Rasierklinge hergestellt und nach mikroskopischer Untersuchung auf Umkehrfilm abgelichtet.

Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente zeigen, daß

1. die CFDV DNA eine als Promotor aktive Region enthält;
2. dieser Promotor, obwohl er aus einem monokotyle Pflanzen infizierenden Virus stammt, immerhin 30 — 50% der Aktivität des starken CaMV35S-Promotors in Protoplasten der dikotylen Pflanzen Tabak und Kartoffel aufweist; und
3. diese Aktivität selektiv auf das Phloem beschränkt ist.

Patentansprüche

1. Verwendung einer aus CFDV stammenden DNA als viralem Promotor zur gewebespezifischen Expression von Genen in transgenen Pflanzen, wobei die aus CFDV stammende DNA die in Fig. 1 dargestellte Struktur aufweist.
2. Verwendung von CFDV-Fragmenten für die Herstellung von chimären Konstrukten zur transienten und stabilen Expression, wobei die CFDV-Fragmente die in Fig. 3A und 3B dargestellte Struktur aufweisen.
3. Transgene Pflanzen, transgene Pflanzenteile sowie Samen von transgenen Pflanzen, die unter Verwendung einer DNA nach Anspruch 1 oder 2 erhalten wurden.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

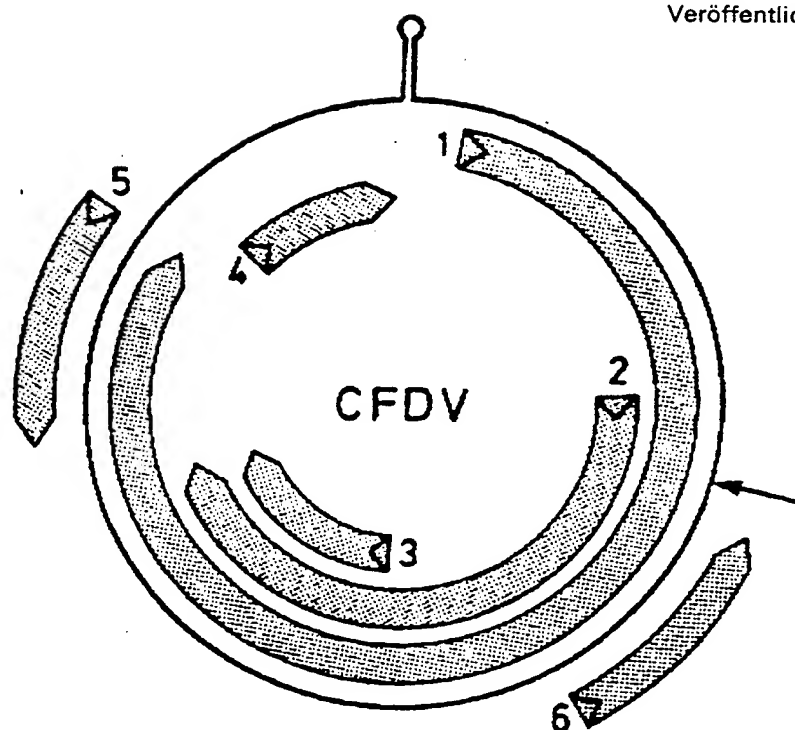


FIG. 1

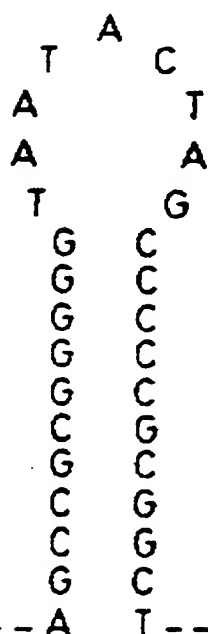


FIG. 2

GEMINIVIRUSES:

CFDV:

---TAATATTAC---

---TAATACTAG--- (-)

---CTAGTATTA--- (+)

CFDU GENOM

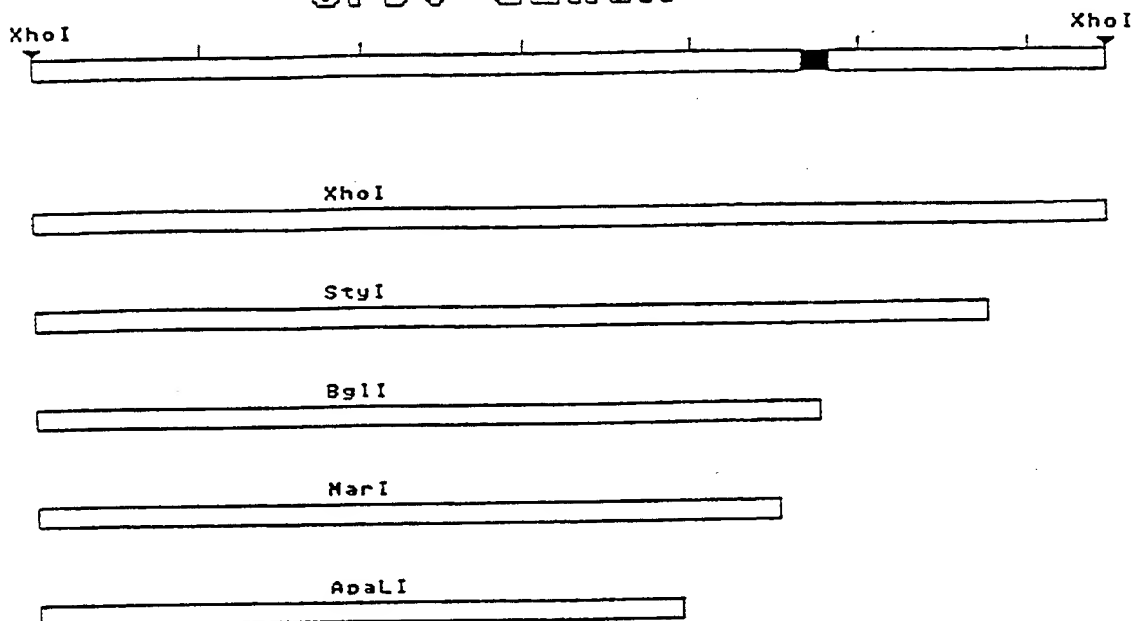


FIG.3(A)

CFDU GENOM

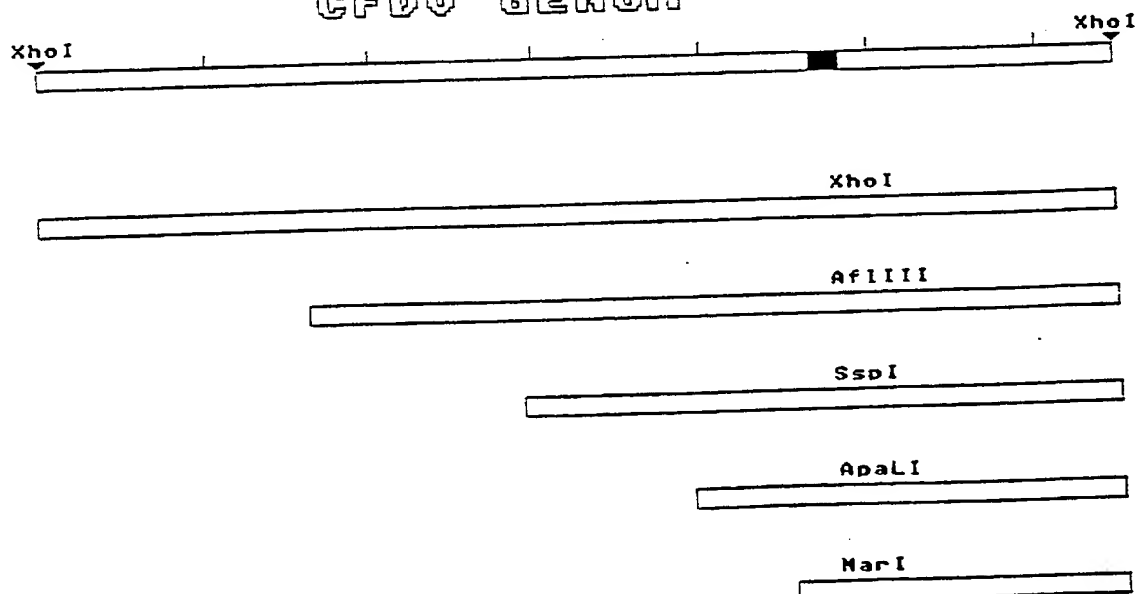


FIG.3(B)